ZUR KONTROLLE DER HEPATISCHEN CHOLESTERINSYNTHESE BEIM GESUNDEN MENSCHEN UND BEIM PATIENTEN MIT ESSENTIELLER HYPERCHOLESTERINAEMIE

Gerhard Müller – Arends

München
~~1970~~
1971

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

ZUR KONTROLLE DER HEPATISCHEN CHOLESTERINSYNTHESE BEIM GESUNDEN MENSCHEN UND BEIM PATIENTEN MIT ESSENTIELLER HYPERCHOLESTERINAEMIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard Müller - Arends
aus Ratibor

München 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. N.Zöllner
Mitberichterstatter: Professor Dr. med. W.Seitz
Dekan: Professor Dr. med. W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 12. 1. 1971

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. E i n l e i t u n g

A. Cholesterinsynthese in der Leber beim Tier und beim Menschen 5

B. Zur Pathogenese der essentiellen Hypercholesterinämie 7

II. M a t e r i a l und M e t h o d i k

A. Material

Stoffwechselgesunde Personen 11

Cholesterinzugabe zur Diät bei stoffwechselgesunden Personen 11

Cholesterinzugabe zur Diät bei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie 11

Krankengeschichte beider Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie 11

B. Methodik 13

Berechnung 14

III. E r g e b n i s s e 15

^{14}C-Acetat-Einbau in Leberbiopsiezylinder von stoffwechselgesunden Personen.Substrat: 0,025 µMol 15

^{14}C-Acetat-Einbau in Leberbiopsiezylinder von stoffwechselgesunden Personen nach Gabe von Cholesterin zur Nahrung. Substrat: 0,025 µMol 15

Seite

^{14}C-Acetat-Einbau in Leberbiopsiezylinder von stoffwechselgesunden Personen. Substrat: 0,3 µMol 15

^{14}C-Acetat-Einbau in Leberbiopsiezylinder von stoffwechselgesunden Personen nach Gabe von Cholesterin zur Nahrung. Substrat: 0,3 µMol 15

^{14}C-Acetat-Einbau in Leberbiopsiezylinder von zwei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie nach Cholesteringabe zur Diät. Substrat: 0,3 µMol 16

IV. Diskussion 17

V. Zusammenfassung 20

VI. Literaturverzeichnis 29

I. EINLEITUNG

A. CHOLESTERINSYNTHESE IN DER LEBER BEIM TIER UND BEIM MENSCHEN

Cholesterin kommt im Körper in beinahe allen Zellen vor. Es findet bei einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen und in allen Membransystemen Verwendung. Das Saugetier kann seinen Cholesterinbedarf durch Eigensynthese decken. Der gesamte Cholesterinbestand des Körpers beträgt etwa 100 - 200 g. Das in Leber und Blut vorhandene Cholesterin wird durch seine besonders rasche Austauschbarkeit dem labilen Cholesterin - Pool zugeordnet und enthält ungefähr 15 g Cholesterin. Messungen dieses labilen Cholesterin-Pools mit Hilfe von Isotopenversuchen zeigen eine Halbwertszeit von etwa 6 Tagen. In der Leber wird täglich etwa 1 - 2 g Cholesterin gebildet.

In Bilanzstudien von Schoenheimer und Breusch (1) konnte 1933 zum ersten Mal gezeigt werden, daß der Cholesterinstoffwechsel bei Tieren einer homöostatischen Kontrolle unterliegt. Aber erst Untersuchungen mit Isotopen (2,3,4) gaben gewisse Hinweise für eine Regulation der Cholesterinsynthese durch Gabe von Cholesterin mit der Diät. Der damit nachgewiesene Mechanismus einer Hemmung der Cholesterinsynthese beim Tier durch Cholesterinverfütterung wurde seitdem genau untersucht. Da inzwischen auch der biologische Syntheseweg des Cholesterins von verschiedenen Arbeitskreisen aufgeklärt werden konnte (5,6,7), war es auch möglich, die Hemmwirkung des Cholesterins bei Zufuhr mit der Diät in der Synthesekette zwischen Acetat und Mevalonat zu lokalisieren. Da die Leber die Hauptquelle des endogen synthetisierten Cholesterins ist und dieses synthetisierte Cholesterin rasch austauschen kann, wurde der Leber die Hauptwirkung bei der homöostatischen Kontrolle des Serumcholesterins zugesprochen. In vielen Untersuchungen an Tieren, vor allem an der Ratte, konnte

eindeutig gezeigt werden, daß die Cholesterinsynthese aus Acetat in der Leber bei Cholesterinzugabe zur Diät stark vermindert wird. Diese Feedback-Hemmung in der Leber - zwischen Acetat und Mevalonat liegend (s.Abb.1)- kann aber bei Tieren auch durch Hungern ausgelöst werden. Desgleichen bewirken hormonelle Einflüsse (z.B. Schilddrüsenhormon), Tritonstimulierung und eventuell der Dunkel - Hell - Rhythmus eine Regulation der Cholesterinsynthese an der gleichen Stelle. Dieses negative Feedback-System auf Cholesterinfütterung wirkt in den Lebern aller bisher untersuchten Tierspezies. Die Cholesterinsynthese in der Dünndarmwand und anderen Geweben wird dagegen durch Cholesterinverfütterung und Hungern nicht beeinflußt.

Die insbesondere von Taylor et al.(8,9) und Cox et al.(10) am Menschen durchgeführten Untersuchungen sprachen nun sowohl in den Isotopenstudien beim Menschen als auch in den Untersuchungen über den ^{14}C - Acetat-Einbau in Leberbiopsiezylinder des Menschen eher dafür, daß beim Menschen gegenüber dem Tier dieser hepatische Feedback-Mechanismus zur Kompensation des mit der Diät zugeführten, aus dem Darm absorbierten Cholesterins nicht existiert. Diese Autoren nahmen deshalb an, daß beim Menschen der Schutz vor der durch Diät herbeiführbaren Hypercholesterinämie durch die hier besonders ausgeprägte begrenzte Absorption von Cholesterin in der Dünndarmwand zustandekäme. Demgegenüber fanden jedoch Bhattatiry und Siperstein (11) in ihren 1963 vorgenommenen Untersuchungen, daß der in vitro-^{14}C-Acetat-Einbau in das Cholesterin der Leberbiopsiezylinder nach Gabe von 3 - 4 g Cholesterin pro Tag über insgesamt 4 Tage eindeutig um etwa 80 - 90 Prozent gesenkt werden konnte. Nach diesen Untersuchungen schien also auch die Leber des Menschen den hepatischen Feedback-Mechanismus zur Regulation der Cholesterinsynthese nach Gabe von Cho-

lesterin zu besitzen.

Da also die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse über die Regulation der hepatischen Cholesterinsynthese - zumindest was die Reaktion auf Cholesterin mit der Diät betrifft - (andere mögliche Regulationsmechanismen wurden bis jetzt nicht untersucht) sehr widersprüchlich waren, soll in dieser Arbeit in erster Linie die Reaktion der hepatischen Cholesterinsynthese beim Menschen und ihre Regulation nach Gabe von Cholesterin mit der Diät untersucht werden.

B. ZUR PATHOGENESE DER ESSENTIELLEN HYPERCHOLESTERINAEMIE

Die essentielle Hypercholesterinämie ist eine erbliche Störung des Lipidstoffwechsels. Die bisher vorliegenden genetischen Untersuchungen lassen einen einzigen Genort annehmen, der für diese Krankheit verantwortlich ist. Die heute gut fundierte Theorie spricht für inkomplett dominante Vererbung, die bei heterozygoten zu mäßiger und bei homozygoten Patienten zu schwerer Hypercholesterinämie führt. Die synonym gebrauchten Bezeichnungen für diese Krankheit sind primäre Hypercholesterinämie, familiäre hypercholesterinämische Xanthomatose oder Hyper-ß-Lipoproteinämie vom Typ II nach Fredrickson bzw. essentielle Hyperproteinämie vom Typ II. Die klare Vererblichkeit spricht dafür, daß es sich hier um eine einheitliche Krankheit handelt, während dies für die anderen Hyperlipoproteinämien nicht in gleichem Maße gilt. Das ist für die Pathogenese der Erkrankung wichtig.

Chemisch ist diese essentielle Hypercholesterinämie charakterisiert durch einen hohen Serumcholesterin-Spiegel, der meist über 400 mg% liegt, und einen hohen Serum-Phospholipid-Spiegel mit einem Verhältnis dieser beiden über eins sowie einem normalen Triglycerid-Spiegel. Die Erhöhung der ß-Lipoproteine ist signifikant. Es bestehen kei-

ne Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel.

Klinisch auffällig sind Zeichen und Symptome einer frühzeitigen Schädigung der Koronarien. An dieser Koronarsklerose sterben die Patienten vom homozygoten Typ im ungünstigsten Falle vor dem 25. Lebensjahr. Als äußeres klinisches Zeichen sieht man in etwa bei 30 - 50 Prozent der Fälle mit essentieller Hypercholesterinämie Sehnen- und Hautxanthome.

Obwohl viele mögliche Mechanismen zur Pathogenese der Krankheit in den letzten Jahren untersucht wurden, konnte bis jetzt nicht einmal geklärt werden, welchem der drei Leitsymptome im Serum (Hypercholesterinämie, Hyperphospholipidämie oder Hyper-ß-Lipoproteinämie) die Priorität in der Pathogenese des metabolischen Defektes zugeordnet werden muß. Verständlicherweise wurde die größte Aufmerksamkeit jedoch immer auf die Untersuchung der möglichen Mechanismen verwendet, die zur Hypercholesterinämie führen können. Hier sind die Schwierigkeiten besonders groß, da erstens im Cholesterinstoffwechsel Regelmechanismen auftreten können, die auch mit Isotopenuntersuchungen nur schlecht zu differenzieren sind und beim Menschen ohnehin nur ungern durchgeführt werden, und zweitens die Ergebnisse, die in verschiedenen Tierspezies gewonnen wurden, untereinander große Schwankungsbreiten zeigen und im Vergleich zum menschlichen Cholesterinstoffwechsel wesentliche Unterschiede aufzuweisen scheinen.

Die Höhe des Serumcholesterin-Spiegels hängt einmal von der Absorption exogenen Cholesterins und der endogenen Reabsorption aus dem Darm ab, von der Ausscheidung über die Gallensäuren, von der Verteilung des Cholesterins zwischen den verschiedenen Pools und von der endogenen Synthese im Körper. Die Fähigkeit des Menschen den Serumcholesterin-Spiegel zu stabilisieren trotz variabler und zum Teil enormer Cholesterinzufuhr, kann in erster Linie darauf zurückgeführt werden,

daß im Darm eine begrenzte Absorptionskapazität für Cholesterin besteht, die zwischen 150 bis maximal 350 mg pro Tag beträgt. Eine unkontrollierte Absorption als pathogenetischer Faktor der Hypercholesterinämie konnte bis jetzt noch nicht sicher ausgeschlossen werden, ist aber nach den vorliegenden Untersuchungen eher unwahrscheinlich.

Die bisherigen Untersuchungen, die darauf zielten, die für die essentielle Hypercholesterinämie verantwortliche Störung in einem Defekt des Katabolismus von Cholesterin zu suchen, erbrachten keine Klärung der Pathogenese, insbesondere da sie von großen methodischen Schwierigkeiten begleitet sind. Die Ergebnisse lassen eine solche Annahme insgesamt eher ausschließen.

Als weitere Ursache für die Anhäufung von Cholesterin im Gewebe und Plasma bei der essentiellen Hypercholesterinämie kommt noch eine exzessive endogene Synthese von Cholesterin in Frage. Moutafis und Myant (12) haben dies kürzlich an sechs Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen noch einmal zusammenfassend untersucht. Sie kommen zum Ergebnis, daß der maximale Einbau von Acetat in Cholesterin im Plasma bei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie zwar gering höher als bei den Kontrollpersonen ist, der Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant. Die Gesamtrate des Turnover ist etwas höher bei den Hypercholesterinämikern, jedoch ist auch dieser Unterschied statistisch nicht bedeutend. So kommen auch diese Autoren aufgrund ihrer Ergebnisse zu dem Schluß, daß bei der essentiellen Hypercholesterinämie die endogene Synthese von Cholesterin nicht sicher erhöht scheint, und daß keine Abnormität im Turnover der Cholesterinester im Plasma vorliegen dürfte.

Nachdem also die verschiedensten Untersuchungen über die Absorption, die Ausscheidung, den Turnover und die endogene Syntheserate von Cholesterin keine eindeutige Klärung der Pathogenese dieser Hypercholesterinämie erbracht hatten,

schien es naheliegend, jene Mechanismen zu prüfen, von denen beim Tier bekannt war, daß sie entscheidend an der Regulation der Cholesterinsynthese mitwirken.

Wie vorher bereits ausgeführt, wird die Cholesterinsynthese beim Tier über einen negativen Feedback-Mechanismus in der Leber reguliert, dessen Sitz zumindest bei Cholesterinverfütterung und bei Fasten zwischen Acetat und Mevalonat (genauer an der ß-Hydroxy-ß-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase /HMG-CoA-Reduktase/) liegt (s.Abb.1). Diese beim Tier so herausragende Stellung der HMG-CoA-Reduktase ließ es aussichtsreich erscheinen, hier eventuell den für die essentielle Hypercholesterinämie verantwortlichen Defekt zu suchen. Ursprünglich war geplant, bei Patienten mit dieser Störung die HMG-CoA-Reduktase in Mikrosomen von Leberbiopsiezylindern vor und nach Gabe von Cholesterin mit der Nahrung mit einem radioaktiven Test zu bestimmen. Dieser Plan konnte nicht durchgeführt werden, da die hierfür benötigte spezifische Radioaktivität von ^{14}C-HMG-CoA für die anfallenden geringen Gewebsmengen nicht ausreichte. Es mußte deshalb so vorgegangen werden, daß der gesamte Acetat-Einbau in Cholesterin in dem durch Leberbiopsie gewonnenen Material nach Cholesteringabe bestimmt wurde. Das heißt, bei Funktionieren des negativen Feedback-Mechanismus mußte der Acetateinbau nach Cholesteringabe (wenn der von den Tieren bekannte negative Feedback-Mechanismus in der Leber des Menschen überhaupt vorhanden ist) wie bei den Kontrollpersonen vermindert sein. Stimmt die Arbeitshypothese, daß der mögliche Defekt bei der essentiellen Hypercholesterinämie in der Regulation der Cholesterinsynthese und zwar an dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ganzen Synthesekette zwischen Acetat und Mevalonat liegt, so war zu erwarten, daß der Acetateinbau durch Cholesteringabe sich nicht verringerte. Zu diesen Untersuchungen konnten wir bei zwei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie den Acetateinbau in Cholesterin nach Cholesteringabe in vitro im Leberbiopsiezylinder bestimmen.

II. MATERIAL UND METHODIK

A. MATERIAL

An insgesamt 22 stoffwechselgesunden Personen (histologische Diagnose des Leberpunktates siehe Tabelle 1 und 2) wurde nach Lokalanaesthesie mit der Menghini-Nadel Lebergewebe mit einem Feuchtgewicht zwischen 2 und 12 mg gewonnen. Die Patienten kamen auf der Allgemeinstation der Medizinischen Poliklinik zur Aufnahme, da zur Sicherung einer eventuellen Lebererkrankung eine diagnostische Untersuchung des Lebergewebes erforderlich war. Die Punktionen wurden zwischen 10 und 12 Uhr vormittags durchgeführt. Die Patienten hatten bis zu diesem Zeitpunkt normale Krankenhauskost zu sich genommen, der Cholesteringehalt in der Nahrung betrug pro Tag etwa 150 - 250 mg.

Bei insgesamt 9 Patienten wurde 3 - 4 Tage lang zu der Nahrung 4 g Cholesterin im Laufe des Tages zugegeben und anschließend die Punktion ausgeführt.

Bei beiden Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie wurde in der gleichen Weise verfahren.

Der erste Patient mit essentieller Hypercholesterinämie (No. 32 in der Tabelle 4) war ein 64jähriger Mann, der seit 8 Jahren wegen seiner essentiellen Hypercholesterinämie in Behandlung stand. Die Erkrankung wurde bei ihm im 56. Lebensjahr diagnostiziert. Mit 50 Jahren traten erstmals starke Angina-pectoris-Anfälle auf. Wegen einer Claudicatio intermittens mußte zu dieser Zeit operativ ein Dacron-Bypass von der linken Arteria iliaca communis zur linken Arteria iliaca externa eingesetzt werden. Im EKG war ein älterer Infarkt im supraapicalen Vorderwandbereich nachweisbar. Die anfangs erhöhten Serumcholesterin-Werte von 539 mg% konnten im Laufe der Jahre mit Diät und ß-pyridylcarbinol bzw. Chlorphenoxyisobutyrat auf Werte zwischen 360 - 380 mg% gesenkt werden. Die Triglyceridwerte lagen dabei zwi-

schen 160 - 240 mg%. Zum Zeitpunkt der Leberpunktion betrug der Serumcholesterin-Spiegel 410 mg% und der Triglyceridspiegel 260 mg%. Die histologische Untersuchung des Lebergewebes, das auch zum ^{14}C-Acetat-Einbau in Cholesterin verwendet wurde, gab folgenden Befund: in höchstens 10 % klein- bis großtropfige Leberzellverfettung, nur vereinzelte Entzündungszellen in den nicht vergrösserten Portalfeldern; die Leberzellen zeigen Kernpolymorphie und aufgelockertes Cytoplasma; Diagnose: geringe Leberzellverfettung mit geringer entzündlicher Reaktion. Die Cholesterinsenkenden Medikamente wurden 10 Tage vor der Leberpunktion abgesetzt. Sowohl Familien-Anamnese als auch Anamnese und klinisch-chemische Befunde weisen den Patienten als essentiellen Hypercholesterinämiker vom heterozygoten Typ aus.

Der zweite Patient mit essentieller Hypercholesterinämie (No. 33 in der Tabelle 4) war zum Zeitpunkt der Leberpunktion 48 Jahre alt. Mit 41 Jahren wurde bei ihm erstmals eine Hypercholesterinämie festgestellt. Der Patient war seit 7 Jahren wegen seiner Hypercholesterinämie in der Behandlung der Klinik. Er litt an cerebralen Durchblutungsstörungen (in der Schädelübersicht eindeutige Gefäßverkalkungen), im EKG zeigten sich eindeutige Hinweise auf Koronarsklerose, im Röntgenbild sah man Kalkeinlagerungen in der Aorta und den großen Beckengefäßen. Im linken Ellenbogen, über den Strecksehnen und den Patellarsehnen waren Xanthome sichtbar. Zu Beginn der Behandlung war das Gesamtcholesterin 587 mg %, das freie Cholesterin 183 mg %, das Ester-Cholesterin 404 mg %, der Esterquotient 69 %, die Gesamtlipide 1630 mg %, die Phospholipide 452 mg % und das Neutralfett 309 mg %. In der Lipoprotein-Elektrophorese war die β-Bande mit einer essentiellen Hypercholesterinämie vom Typ II vereinbar. Der Cholesterinspiegel zum Zeitpunkt der Leberpunktion betrug 470 mg %

und der Triglyceridspiegel 180 mg %. Familien-Anamnese: der Vater war mit 54 Jahren an einer Herzerkrankung gestorben, die Mutter leidet seit dem 60. Lebensjahr an Herzbeschwerden, ein Bruder starb mit 6 1/2 Jahren an Polio, zwei Schwestern sind im 30. und 35. Lebensjahr, gesund, ein Bruder ist mit 36 Jahren an einem Hirntumor gestorben und bei einem weiteren Bruder, der auch seit 8 Jahren in Behandlung der Klinik steht, ist seit dem 34. Lebensjahr eine Hypercholesterinämie bekannt. Die Histologie des Leberpunktates, das auch zum ^{14}C-Acetat-Einbau verwendet wurde, zeigte in höchstens 10 % klein- bis mitteltropfige Verfettung, sonst war kein pathologischer Befund zu erheben. Cholesterinsenkende Medikamente wurden 10 Tage vor der Leberpunktion abgesetzt.
Beide Patienten waren euthyreot.

B. METHODIK

Die Leberbiopsiezylinder wurden in Krebs-Ringer-Lösung, ph = 7,4, aufgefangen, vor dem Abwiegen wurden die Zylinder sorgfältig auf Filterpapier abgetrocknet. Die Inkubationslösung bestand aus 0,5 ml Krebs-Ringer-Lösung, ph = 7,4, 0,225 µMol Na-Acetat und 0,075 µMol ^{14}C-Acetat (57 mC/mMol, Radiochemical Centre Amersham). Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden bei 37° C im Wasserbad (unter ständigem Schütteln). Anschließend wurde die Reaktion mit 0,3 ml 16 M. KOH und 0,5 mg Cholesterin in 0,5 ml Aethanol gestoppt. Daraufhin wurde die Hydrolyse im Rückflußkühler 1 Stunde bei 100 - 120° C durchgeführt. Überführen in Meßzylinder unter Nachspülen mit zwei Mal je 1,25 ml Aqua destillata, zwei Mal je 2,5 ml Aethanol und ein Mal mit 5,0 ml Petrolaether (Siedepunkt 40 - 65° C). Nach mehrmaligem Schütteln wurde die obere Phase nach 18 Stunden abgezogen und durch ein kleines Faltenfilter in einen Rundkolben filtriert. Die untere Phase wurde anschließend zwei Mal mit je 5,0 ml Petrol-

aether geschüttelt, und die obere Phase ebenfalls wieder durch ein Faltenfilter in denselben Rundkolben filtriert. Der Petrolaether im Rundkolben wurde im Vakuum abgezogen, und der Rückstand in 2,5 ml Dioxan gelöst. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 2,0 ml der Dioxanlösung zu 10,0 ml Szintillatorlösung (7,0 g PPO, 0,3 g POPOP, 100,0 g Naphthalin und 1,0 l Dioxan) und 0,5 ml Aqua destillata zugegeben, gut geschüttelt und in TriCarb die Radioaktivität gezählt. Die Zählzeit betrug 10 Minuten.

BERECHNUNG:

$$\frac{(I_{pm})\ \text{Unverseifbares}}{\frac{(I_{pm})\ \text{Acetat}}{\mu\text{Mol Acetat}}} = \text{Einbau von Acetat in Cholesterin } \mu\mu\text{Mol/mg/3 h}$$

bzw.:

$$\frac{\text{Einbau von Acetat in Cholesterin}}{x\ \text{mg}} = \text{Einbau } \mu\mu\text{Mol/mg/3 h}$$

Die maximale Substratkonzentration von 0,3 µMol Na-Acetat wurde als Substratoptimum in vorherigen Untersuchungen an Rattenleberschnitten bestimmt. Der Acetateinbau war in diesen Rattenleberschnitten proportional zur Leberschnittmenge.

III. ERGEBNISSE

Tabelle 1 zeigt bei 7 stoffwechselgesunden Personen den Einbau von Acetat in Cholesterin bei normaler Krankenhauskost, wobei als Substrat 0,025 µMol Na-Acetat eingesetzt wurde. Die Werte für das dabei während einer Stunde synthetisierte Cholesterin aus Acetat betragen zwischen 1,43 und 3,7 µµMol/mg Leberfeuchtgewicht. Bei dem unter No. 7 in Tabelle 1 aufgeführten Wert handelt es sich um das Lebergewebe einer Person mit Hyperthyreose. Vom Tierversuch her ist bekannt, daß Schilddrüsenhormone die endogene Synthese in der Leber hemmen, d.h. der mit 0,73 µµMol/mg Leberfeuchtgewicht/Stunde bestimmte, unter den Normalwerten liegende Wert läßt sich mit dieser Stoffwechselerkrankung vereinbaren. Die in Tabelle 1 unter No. 8 und 9 aufgeführten Werte ergaben sich bei in vitro-Inkubation von Leberbiopsiezylindern nach dreitägiger Gabe von 4 g Cholesterin pro Tag. Diese beiden Werte zeigen eine beinahe vollständige Hemmung der in vitro-Synthese. Auch die in Tabelle 2 aufgeführten Werte, die unter etwas veränderten Inkubationsbedingungen erzielt wurden (als Substrat wurden hierbei 0,3 µMol Na-Acetat eingesetzt, einem aus Rattenleberschnitten gefundenen Substratoptimum), zeigen eine Übereinstimmung mit den Werten der Tabelle 1, d.h. die Werte bewegen sich wiederum zwischen 1,4 und 2,4 µµMol/mg Leberfeuchtgewicht/Stunde mit einem Durchschnitt von 1,61 µµMol/mg Leberfeuchtgewicht/Stunde synthetisiertem Cholesterin. Nach Zugabe von wiederum 4 g Cholesterin zur Nahrung täglich über drei Tage wird der in vitro-Einbau hier auf etwa 90 Prozent gehemmt (s. Tabelle 3). Dieses Ergebnis bedeutet, daß der bei verschiedenen Tierspezies beobachtete negative Feedback-Mechanismus auf Cholesterinzugabe zur Diät auch für den Menschen gültig ist.

In Tabelle 4 ist unter No. 32 der in vitro-Einbau von

Acetat in das Cholesterin des Leberbiopsiezylinders eines heterozygoten essentiellen Hypercholesterinämiker nach Gabe von 4 g Cholesterin täglich über drei Tage aufgeführt. Der mit 4,68 µMol/mg Leberfeuchtgewicht/h synthetisiertes Cholesterin erhaltene Wert liegt etwa um das Zehnfache über den vergleichbaren Werten in der Tabelle 3, die unter denselben Bedingungen bei stoffwechselgesunden Personen erhalten wurden. Ebenso liegt dieser Wert noch deutlich über sämtlichen Werten, die man erhält, wenn das Lebergewebe von stoffwechselgesunden Personen ohne vorherige Zugabe von Cholesterin zur Nahrung mit ^{14}C-Acetat inkubiert wird. Für den unter No. 33 in Tabelle 4 aufgeführten Wert von 10,13 µMol/mg Leberfeuchtgewicht/Stunde gilt im wesentlichen das gleiche. Hier kommt der Unterschied zu den Vergleichswerten aus Tabelle 3 noch deutlicher heraus. Der in vitro-Einbau von Acetat in das Cholesterin ist um ungefähr 20 - 25 Mal höher als diese Vergleichszahlen. Er liegt noch um etwa 5 Mal höher als die Werte für den in vitro-Einbau bei den stoffwechselgesunden Personen, denen kein Cholesterin zur Nahrung zusätzlich zugegeben worden war.

Übersichtlich sind diese Verhältnisse in Abbildung 2 und 3 noch einmal dargestellt.

IV. DISKUSSION

Nachdem die in der Literatur gefundenen Aussagen über das Funktionieren eines negativen Feedback-Mechanismus der Cholesterinsynthese in der Leber des Menschen sehr widersprüchlich waren (8,9,10,11), sollte in diesen Untersuchungen versucht werden, eine definitive Aussage hierüber zu finden. Die bei stoffwechselgesunden Personen gefundene in vitro-Synthese in Leberbiopsiezylindern nach Cholesterinzugabe zur Diat belegt eindeutig, daß auch beim Menschen ein negativer Feedback-Mechanismus in der endogenen Cholesterinsynthese in der Leber auf exogen zugeführtes Cholesterin besteht. Bei einem Substratoptimum von 0,3 µMol Na-Acetat in der Inkubationslösung wird die in vitro-Synthese des Cholesterins aus Acetat um durchschnittlich 90 Prozent gehemmt.

Diese Untersuchungen wurden in erster Linie nicht nur durchgeführt, um das Funktionieren eines negativen Feedback-Mechanismus beim Menschen zu demonstrieren, sondern waren auch Vorraussetzung für die Untersuchung einer Arbeitshypothese für einen möglichen metabolischen Defekt in der Regulation der Cholesterinsynthese bei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie. Nachdem in der Literatur der letzten Jahre weder Abnormitäten in der Absorption des mit der Nahrung zugeführten Cholesterins, des Katabolismus von Cholesterin, des Turnover in der Verteilung des Cholesterins zwischen den verschiedenen Pools im Körper und der gesamten endogenen Syntheserate im Körper bei diesen Patienten gefunden werden konnte, schien es aussichtsreich - zumal die genetischen Untersuchungen für eine inkomplett dominante Vererbung sprechen - , nach einem, wie auch immer gearteten Enzymdefekt bei dieser Krankheit zu suchen. Die beim Tier so auffällige Lokalisation eines negativen

Feedback-Mechanismus in der Leber an der ß-Hydroxy-ß-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase legte eine Untersuchung dieses Syntheseschrittes und der Einwirkung auf mit der Diät zugeführtes Cholesterin sehr nahe. Das heißt, sollte es sich bei dieser Krankheit, wie die genetischen Untersuchungen wahrscheinlich machten, um einen inborn error of metabolism handeln, so schien die Aussicht, den Enzymdefekt an dieser für die Synthese des Cholesterin und ihrer Regulation so herausragenden Stellung zu finden, am wahrscheinlichsten. In einem negativen Feedback-Mechanismus wird die synthetische Reaktion, in der das Endprodukt die Reaktion hemmt, immer spezifisch an einer einzigen Reaktion in der Synthesekette gehemmt,die typischerweise immer an der ersten Reaktion jenseits des letzten Verzweigungspunktes in der Sequenz liegt. Das ist bei der ß-Hydroxy-ß-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase der Fall, und zwar handelt es sich hier um den Verzweigungspunkt zwischen der Fettsäure- und der Terpensynthese (s. Abb.1).

Nachdem also stoffwechselgesunde Versuchspersonen unter den hier angewandten Versuchsbedingungen einen negativen Feedback-Mechanismus gezeigt hatten, war es nicht schwierig, diese Arbeitshypothese auch bei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie zu überprüfen. Sowohl bei dem Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie vom heterozygoten Typ als auch bei jenem vom homozygoten Typ konnte im in vitro-Einbau von Acetat in Cholesterin nach Cholesteringabe keine Hemmung der Cholesterinsynthese beobachtet werden. Wie vermutet, ist also bei diesen Patienten der metabolische Defekt spezifisch in einem Schritt lokalisiert, der auch beim Tier die Cholesterinsynthese auf exogene Cholesteringabe reguliert. Die beiden Ergebnisse könnten darüber hinaus noch weiter gedeutet werden. Bei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie vom homozygoten Typ scheint das Fehlen der Hemmung eindeutiger zu sein als bei Patienten vom heterozygoten Typ. Auffallend ist, daß der in vitro-Einbau

von Acetat in Cholesterin bei beiden Patienten wesentlich über jenen Werten liegt, die bei stoffwechselgesunden Personen ohne zusätzliche Cholesteringabe zur Krankenhauskost gefunden werden. Das könnte man so deuten, daß die normale Krankenhauskost mit ihrem zwischen 150 - 250 mg pro Tag liegenden Cholesteringehalt bereits eine Hemmung der endogenen Synthese bewirkt, oder anders ausgedrückt, die bei vollständig Cholesterinfreier Nahrung erhaltenen Werte müßten über den in Tabelle 1 und 2 aufgeführten Werten liegen. Es kann im Augenblick nicht ausgeschlossen werden, ob nicht doch zusätzlich bei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie ein weiterer Defekt zum Beispiel im Katabolismus des Cholesterins vorliegt. Interessanterweise gibt es ein Beispiel für das Fehlen eines negativen Feedback-Mechanismus in der Cholesterinsynthese, das von Siperstein und Fagan (13) entdeckt wurde. Bei ihren Untersuchungen über die Cholesterinsynthese in Hepatomen von Mäusen und von Menschen fanden sie das Fehlen einer Feedback-Kontrolle sowohl bei exogener Cholesterinzufuhr als auch bei Fasten. In Abbildung 4 wird in einem Schema versucht, den möglichen Feedback-Defekt bei essentieller Hypercholesterinämie aufzuzeichnen. Wie die Untersuchungen zeigten, kommt es bei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie zu einer von der Cholesterinabsorption unkontrollierten Cholesterinsynthese in der Leber. Aus den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen ist nicht abzulesen, ob der Defekt primär am Enzym, am Endprodukt oder an einer anderen Stelle liegt.

Es bleibt zu zeigen, ob das Fehlen dieses negativen Feedback-Mechanismus der Cholesterinsynthese auf mit der Nahrung zugeführtes Cholesterin tatsächlich ganz spezifisch für die genetisch einheitliche Gruppe der essentiellen Hypercholesterinämie vom Typ II ist oder auch für Mischformen gilt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Aus den Untersuchungen verschiedener Tiergruppen ist bekannt, daß die Cholesterinsynthese in der Leber über einen negativen Feedback-Mechanismus, der zwischen Acetat und Mevalonat liegt, reguliert wird. Die Hemmung der Synthese kann durch Cholesterinzufuhr mit der Diät, durch Fasten und durch Schilddrüsenhormone ausgelöst werden. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen denselben Mechanismus in der Leber des Menschen auf Cholesterinzufuhr mit der Nahrung. Die Synthese wird bei Zugabe von 4 g Cholesterin täglich über drei Tage um durchschnittlich 90 Prozent gehemmt. Bei zwei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie fehlt dieser negative Feedback-Mechanismus oder diese Rückkopplung in der Leber und scheint somit der entscheidende metabolische Defekt bei dieser Krankheit zu sein.

TABELLE 1.: ^{14}C-Acetat-Einbau in Leberbiopsiezylinder von Menschen. Synthetisiertes Cholesterin in µµMol/mg Frischgewicht/Stunde. Als Substrat wurden 0,025 µMol Na-Acetat eingesetzt.

No.	Chol. in µµMol/mg Leber/h	Diagnose
1	3,70	Hepatitis
2	2,34	M. Boeck
3	2,00	Hepatitis
4	1,67	persist.Hepatitis
5	1,46	Fettleber
6	1,43	Fettleber
7	0,73	Fettleber bei Hyperthyreose !!
	Substrat: 0,025 µMol Na-Acetat Gabe von 4 g Cholesterin täglich über drei Tage.	
8	0,0167	Fettleber
9	0,0200	Hepatitis

TABELLE 2.: ^{14}C-Acetat-Einbau in menschliche Leberbiopsiezylinder zur Kontrolle der Cholesterinsynthese. Gemessen wurde synthetisiertes Cholesterin in µMol/mg Frischgewicht/Stunde. Als Substrat wurden 0,3 µMol Na-Acetat eingesetzt.

No.	Chol. in µMol/mg Leber/h	Klinische Diagnose
10	2,43	Hepatitis
11	2,40	Hepatitis
12	2,20	Fettleber, V.a. Hypercholesterinämie.
13	2,14	Fettleber
14	2,05	Fettleber
15	1,75	Fettleber
16	1,72	Fettleber
17	1,64	Fettleber
18	1,60	Hepatitis
19	1,44	Hepatitis
20	1,38	Hepatitis
21	1,05	Zirrhose
22	0,87	Hepatitis
23	0,74	Zirrhose
24	0,71	Medikam.-Abusus
Durchschnitt:	1,61	

TABELLE 3.: ^{14}C-Acetat-Einbau in menschliche Leberbiopsiezylinder zur Kontrolle der Cholesterinsynthese nach Gabe von 4 g Cholesterin täglich über drei Tage. Gemessen wurde synthetisiertes Cholesterin in µµMol/mg Frischgewicht/Stunde. Als Substrat wurden 0,3 µMol Na-Acetat eingesetzt.

No.	Cholesterin in µµMol/mg Leber/h
25	0,525
26	0,432
27	0,432
28	0,315
29	0,284
30	0,167
31	0,074

TABELLE 4.: ^{14}C-Acetat-Einbau in menschliche Leberbiopsiezylinder zur Kontrolle der Cholesterinsynthese nach Gabe von 4 g Cholesterin täglich über drei Tage bei zwei Patienten mit essentieller Hypercholesterinämie. Gemessen wurde synthetisiertes Cholesterin in µµMol/mg Frischgewicht/Stunde. Als Substrat wurden 0,3 µMol Na-Acetat eingesetzt.

No.	Cholesterin in µµMol/mg Leber/h
32	4,68
33	10,13

Abb. 1

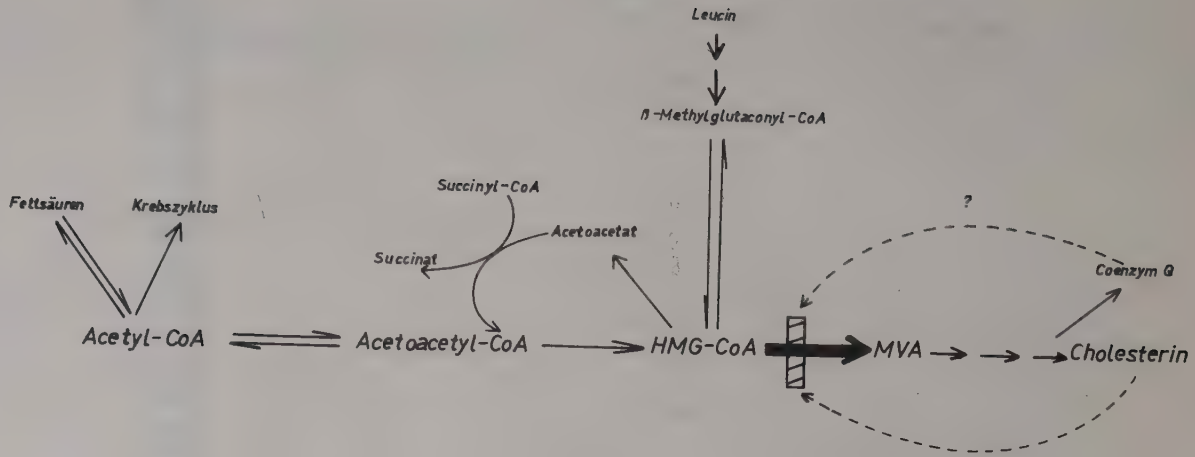

Leucin
ß-Methylglutaconyl-CoA
Fettsäuren
Krebszyklus
Succinyl-CoA
Acetoacetat
Succinat
?
Coenzym Q
Acetyl-CoA
Acetoacetyl-CoA
HMG-CoA
MVA
Cholesterin

Abb. 2 Acetateinbau in Leberbiopsiezylinder von stoffwechselgesunden Menschen

o = normale Krankenhauskost

x = Zugabe von 4 g Cholesterin/Tag zur Krankenhauskost

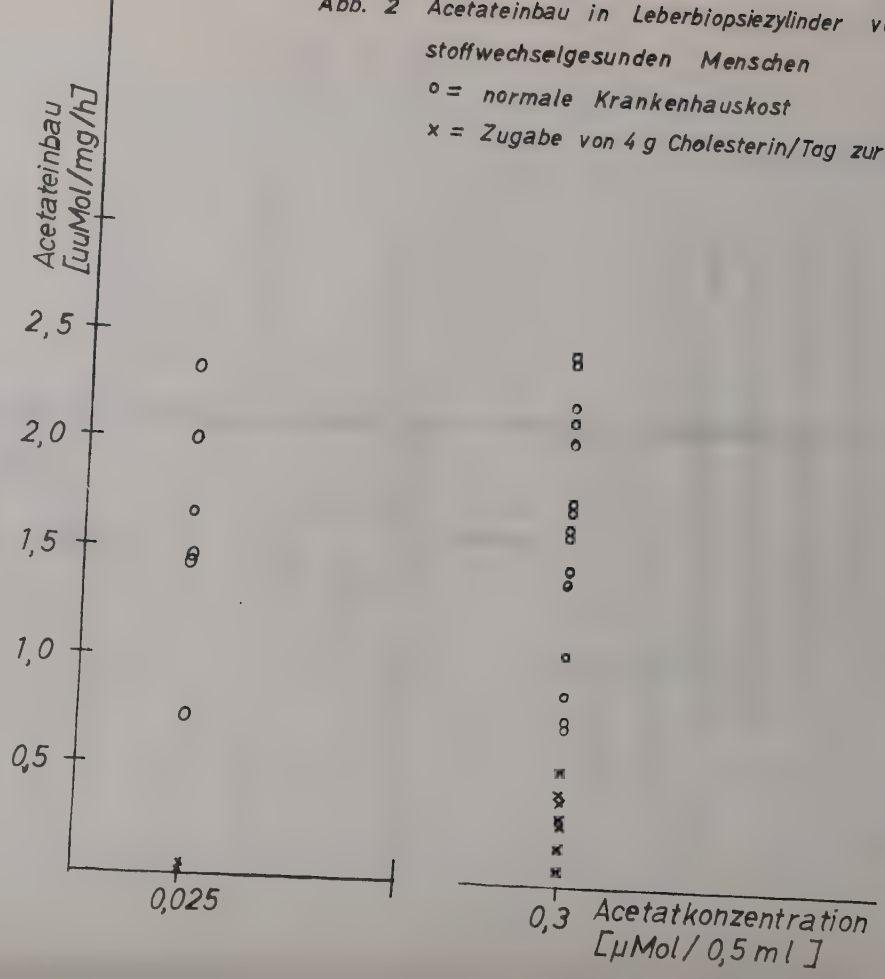


Abb. 3 Acetateinbau in Leberbiopsiezylinder von stoffwechselgesunden Menschen u. Pat. mit ess. HCH

°= normale Krankenhauskost

×= Zugabe von 4 g Cholesterin/Tag über 3 Tage zur Krankenhauskost

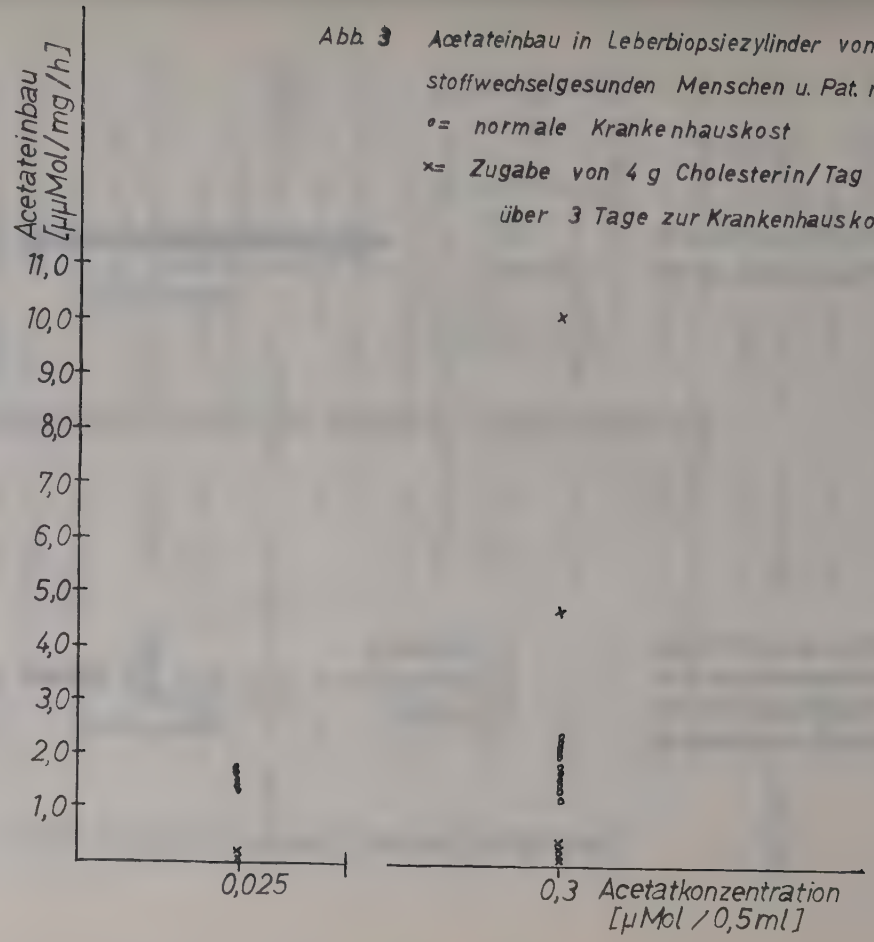
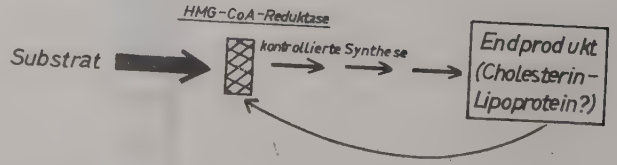
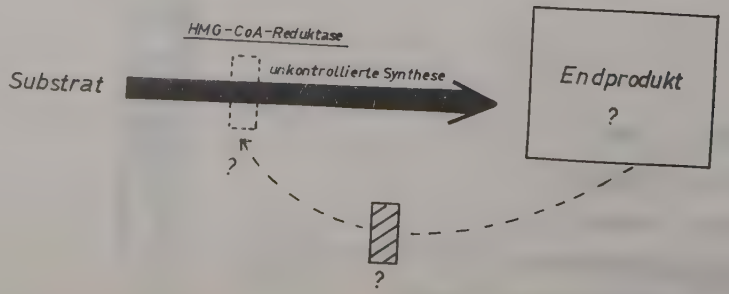


Abb. 4 Normale Feedback-Regulation in der Leber



Homöostatische Kontrolle
des Serumcholesterins
(d.h. von Cholesterinzugabe
abhängige Cholesterinsynthese)

Möglicher Feedback-Defekt bei der essentiellen Hypercholesterinämie



Von der Cholesterinzugabe
unabhängige Cholesterinsynthese

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1.) SCHOENHEIMER, R., und F. BREUSCH :
J. biol. Chem. 103, 439 (1933)

2.) GOULD, R.G. :
Amer. J. Med. 11, 209 (1951)

3.) FRANTZ, I.D.,Jr., H.S. SCHNEIDER, und B.T. HINKELMAN :
J. biol. Chem. 206, 465 (1954)

4.) TOMKINS, G.M., H. SHEPPARD, und I.L. CHAIKOFF :
J. biol. Chem. 201, 137 (1953)

5.) LYNEN, F. :
Chem. Weekblad 43, 581 (1960)

6.) BLOCH, K. :
Angew. Chem. 77, 944 (1965)

7.) POPJÁK, G., und J.W. CORNFORTH :
Adv. in Enzymology 22, 281 (1960)

8.) TAYLOR, C.B., und K.J. HO :
Arch. Path. 84, 3 (1967)

9.) TAYLOR, C.B., B.MIKKELSON, J.A.ANDERSON, D.T.FORMAN, A.K.ASDEL, und K.J.HO :
Medical Times 95, 489 (1967)

10.) COX, G.E., C.B.TAYLOR, D.PATTON, C.DAVIS, Jr., und N.BLANDIN :
Arch. Path. 76, 60-88 (1963)

11.) BHATTATHIRY, P.M., und M.D.SIPERSTEIN :
J. Clin. Invest. 42, 1613 (1963)

12.) MONTAFIS, C.D., und N.B.MYANT :
Clin. Sci. 37, 61-68 (1969)

13.) SIPERSTEIN, M.D., und V.M.FAGAN :
Adv.in Enzyme Regul. 2, 249 (1964)

Ganz besonderen Dank sage ich Herrn Professor Dr. N. Zöllner und Herrn Dr. W. Kaiser für das Interesse, das sie an meiner Arbeit gezeigt haben.

LEBENSLAUF

Am 24. Februar 1943 wurde ich in Ratibor/OS geboren. Meine Eltern sind der Senatsrat am Bundespatentgericht Dr. jur. Hans-Joachim Müller-Arends und dessen Ehefrau Magdalena geb. Petersen. 1946 flohen meine Eltern mit meinem älteren Bruder und mir aus Schlesien nach Niedersachsen. Nach vierjähriger Volksschulzeit trat ich in das Wilhelm-Gymnasium zu Braunschweig ein. Ich wählte den humanistischen Zweig dieser Schule und legte im Februar 1962 die Reifeprüfung ab. Nach zweijährigem Bundeswehrdienst immatrikulierte ich mich 1964 zum Sommersemester in der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg. Dort legte ich im Herbst 1965 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und bestand im Frühjahr 1967 die ärztliche Vorprüfung. 1967 wechselte ich an die Universität München, wo ich im Juni 1970 die ärztliche Prüfung ablegte.